

Z. Klin. Chem. Klin. Biochem.
10. Jg. 1972, S. 552—554

Zur Methodik der Lipoprotein-Elektrophorese auf Celluloseacetat-Folie im Routinelaboratorium

Von G. B. ZIEGLER

Klin.-chem. Zentrallaboratorium (Chefarzt: Dr. F. Wosegien) des Kreiskrankenhauses Ludwigsburg

(Eingegangen am 30. Juni/24. August 1972)

Eine einfache, für das Routinelaboratorium geeignete Methode der Lipoprotein-Elektrophorese wird beschrieben. Sie zeichnet sich durch scharfe Trennung der Fraktionen und durch eine intensive, stabile Färbung aus. Aussagekraft und Fehlerquellen der Methode werden diskutiert.

Electrophoresis of lipoproteins on cellulose acetate in the routine laboratory

A simple method is described for the electrophoresis of lipoproteins, which is suitable for the routine laboratory. It is characterized by a sharp separation and an intense, stable staining of the fractions. The diagnostic value and the sources of error in the method are discussed.

In Abwandlung der von KLEMENS (1) modifizierten Lipoproteinelektrophorese auf Celluloseacetatfolien nach CHIN (2) haben wir Testbedingungen erarbeitet, die sich wegen des geringen Aufwands zur Verwendung im klinisch-chemischen Routinelaboratorium eignen. Eine densitometrische Auswertung ist möglich.

Material und Methodik

Apparatur zur Mikrozonenelektrophorese auf Celluloseacetatfolien (z. B. Fa. Boskamp).

Densitometer zur Auswertung von Mikrozonenelektrophoresen (z. B. Chromoscan der Fa. Joyce, Loebel & Co. Ltd.).

Heizplatte mit Magnetrührer.

Celluloseacetatfolien (Schleicher und Schüll).

Michaelispufler 0,06 mol/l pH 8,6.

Ölrot 0 (Serva), Methanol p. a., Eisessig, Natriumhypochloritlösung 12,5% (technisch).

Das nach mindestens 12-stündiger Nahrungskarenz gewonnene Patientenserum wird möglichst frisch zur Elektrophorese eingesetzt. Kleine Probenmengen werden für evtl. notwendige weitere Untersuchungen bei -78°C (Methanol/Trockeneis) eingefroren und bei -18°C gelagert. Nach dem Auftauen werden sie nicht wieder eingefroren. Stets werden Serum-Cholesterin und Serum-Triglyceride mitbestimmt. Die Verwendung von Heparinplasma bringt keine Vorteile.

Elektrophorese

Die Vorbereitung der Folien erfolgt wie bei der Eiweiß-Mikrozonenelektrophorese üblich. Zum Auftragen der Probe sind wir nach vorübergehendem Gebrauch von Mikrokapillaren (1) dazu übergegangen, die Schmalkante eines Objektträgers durch Eintauchen in einen Tropfen Serum gleichmäßig zu benetzen und kurz kathodenwärts auf die Folie aufzulegen. Hierbei werden 3–5 μl Serum in einer scharf begrenzten Startlinie aufgetragen. Nach vollständigem Eintrocknen der Probe in die Folie erfolgt die Trennung bei 250 V. Die Dauer ist abhängig von der erreichten Trennstrecke (mindestens 3 cm, kontrollierbar an der deutlichen Albuminfront), etwa 40 min. Danach werden die Folien feucht in das Farbbad eingelegt und 12–24 h bei 37°C gefärbt.

Farbbad und Transparenzverfahren

Zu 160 ml siedendem Methanol werden 0,5 g Ölrot 0 gegeben und 5 min unter ständigem Rühren aufgeköcht. Auf einen Rück-

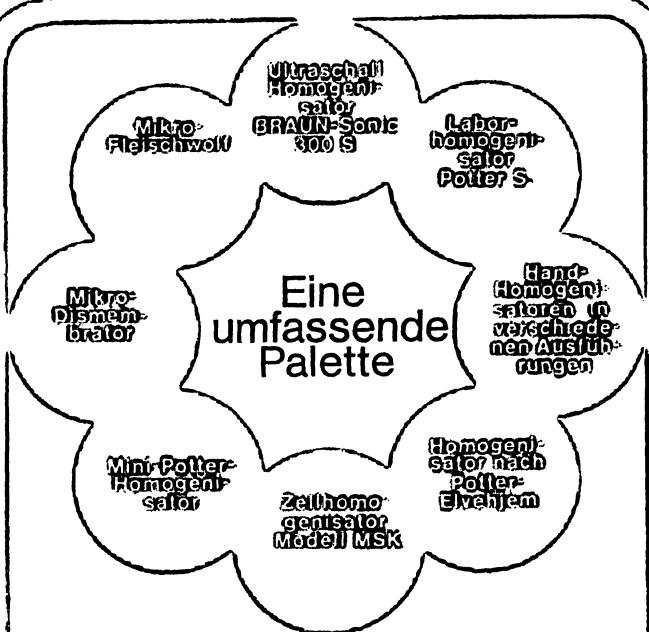
flußkühler kann verzichtet werden. Langsam wird die ständig siedende Lösung mit Methanol/Wasser (1 l + 1 l) auf 300 ml aufgefüllt, wobei ein Ausfallen des Ölrot vermieden werden soll. Die Lösung soll zum Schluß tiefrot und nur gering getrübt sein. Der Wassergehalt soll 30% nicht übersteigen, da dies die Löslichkeit des Ölrot stark vermindert, soll aber nicht unter 20% bleiben, da dann Lipide aus der Folie herausgelöst werden. Nach dem Abkühlen wird die Farblösung ins Färbegefäß dekantiert und abgedeckt bei 37°C aufbewahrt. Sie ist etwa 7 Tage gebrauchsfähig.

Zu 80 ml 5proz. Essigsäure werden 5 ml 12,5proz. Natriumhypochloritlösung gegeben (Abzug). Die Folien werden einzeln dem Farbbad entnommen, durch leichtes Darüberwischen von aufgelagertem Ölrotniederschlag befreit und einzeln 15–20 s in der Natriumhypochloritlösung entfärbt. Der Untergrund sollte nur leicht rötlich, die Lipoproteinfraktionen tiefrot gefärbt sein. Sollte der Farbeffekt nicht ausreichend sein, kann der Färbevorgang nach kurzem Spülen der Folie in Wasser fortgesetzt werden. Vor der Transparenzbehandlung werden die Folien 10 min in Wasser gespült. Sie werden dann für 2 s ins Transparenzbad (Eisessig/Methanol 900 ml + 100 ml) eingetaucht und sofort auf einen Objektträger aufgezogen. Gasblasen werden wie üblich mit einem Glasstab oder dgl. entfernt. Werden die Folien vor der Transparenzbehandlung aufgezogen, dann bilden sich im Transparenzbad Gasblasen unter der Folie, die nicht entfernt werden können. Unter Warmluft werden die transparenten Folien getrocknet. Falls notwendig, kann dann die Transparenzbehandlung jetzt an den aufgezogenen Folien wiederholt werden.

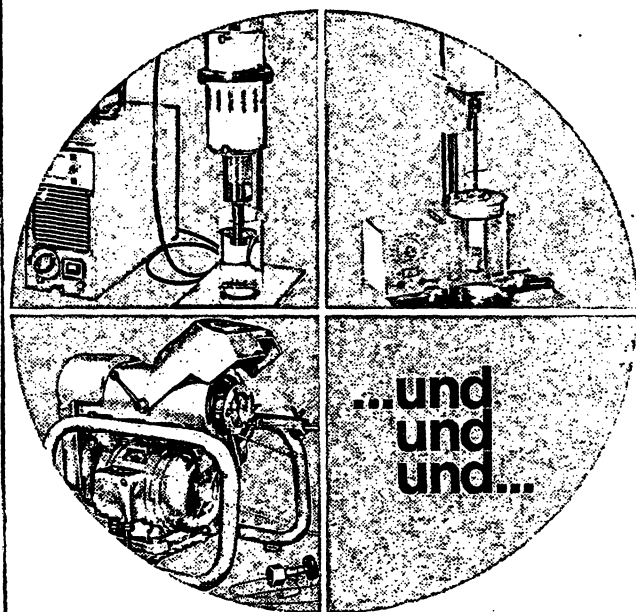
Ergebnisse und Diskussion

Mit der geschilderten Methode lassen sich Lipoproteinelektrophoresen mit guter Reproduzierbarkeit durchführen. Bei mehrfacher ($n = 30$) Auftrennung eines Normalserums betrug die Standardabweichung für die α -Lipoproteine 2,3%, für die prä- β -Lipoproteine 0,9% und für die β -Lipoproteine 3,0% der Gesamttextinktion. KLEMENS (1) gab Streubreiten von 3,6%, 2,9% und 3,0% bei mehrfacher Auftrennung eines Normalserums an.

Die Ergebnisse der Lipoproteinelektrophorese auf Celluloseacetat sind denen der Auftrennung im Agarosegel vergleichbar (1, 3, 5, 6), die Trennschärfe ist



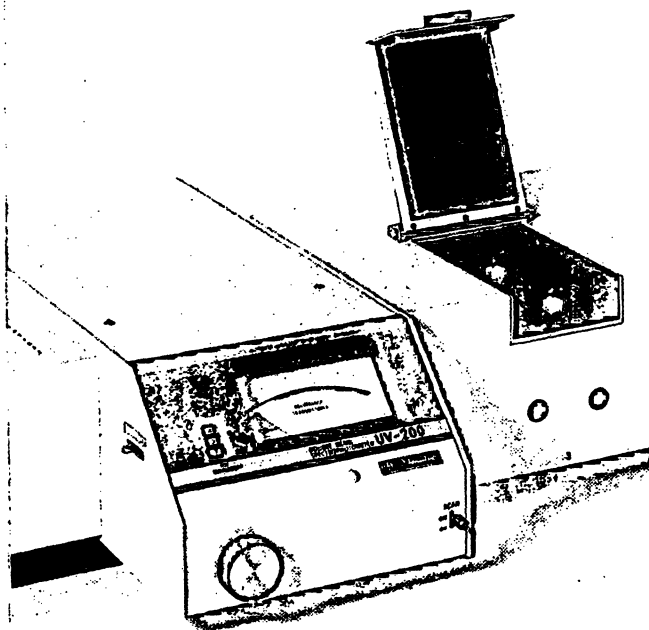
von Laborhomogenisatoren für alle Homogenisierverfahren zu Forschungs- und Untersuchungszwecken in Biologie, Chemie, Physik, Botanik, Zoologie, Pharmakologie, Physiologie und anderen Disziplinen. Jedes Gerät ist für ein spezielles Verfahren besonders geeignet.



B. Braun Melsungen
Aktiengesellschaft

Medizin-u. Labortechnik

3508 Melsungen, Postfach 110 und 120



Shimadzu-UV-200 Spektralphotometer

Registrierendes Zweistrahlphotometer hervorragender Qualität. Ein neuartiger Strahlenteiler garantiert hohe analytische Genauigkeit. Spektralbereich 195 nm bis 850 nm. Czerny-Turner-Gittermonochromator. Einfache Bedienung durch automatische 0 %- und 100 %-Korrektur. Äußerst exakte 100 %-Linie. Ein modernes Gerät zu sehr günstigem Preis.

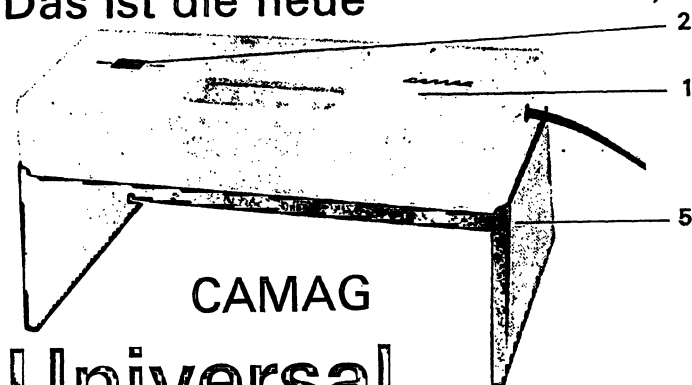
Autorisierte Vertretung:

Colora Messtechnik GmbH
7073 Lorch/Württ. 1, Postfach 5
T (07172) 60 41, FS 07-248 886

Technische Büros (Verkauf und Kundendienst):
1000 Berlin 30, Ansbacher Straße 17-19, T 24 40 90
2000 Hamburg 19, Osterstraße 63, T 4 91 10 34, FS 02-12 947
3000 Hannover, An der Tiefenriede 45, T 88 45 00
4000 Düsseldorf 1, Kronprinzenstr. 62, T 32 01 64, FS 08-587 253
6000 Frankfurt a.M., Röderbergweg 4-6, T 44 60 31, FS 04-11 216
8000 München 19, Dachauer Straße 175, T 19 38 58

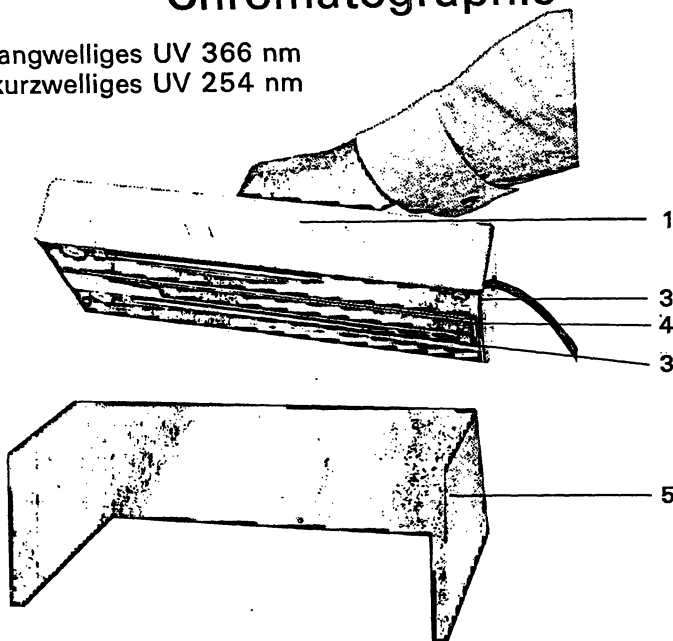
colora

Das ist die neue



CAMAG Universal UV-Lampe für die Dünnschicht- Chromatographie

langwelliges UV 366 nm
kurzwelliges UV 254 nm



- 1 formschönes, handliches Gehäuse aus schlagfestem Kunststoff
- 2 Kombinationsschalter ein - aus - 366 nm - 254 nm
- 3 zwei Röhren für das langwellige UV ergeben eine grosse Leuchtdichte
- 4 abnehmbarer UV-Filter mit geometrisch optimal angeordnetem Fenster für das kurzwellige UV
- 5 Stativ, schirmt Fremdlicht auf drei Seiten wirksam ab

CAMAG

Führend in Dünnschicht-Chromatographie
Dünnschicht-Elektrophorese
Hochspannungs-Elektrophorese

4132 Muttenz/Schweiz
Homburgerstrasse 24
Tel. (061) 53 14 30

1000 Berlin 41
Bismarckstrasse 27-29
Tel. (0311) 791 50 91

TL 15

(176)



Walter de Gruyter Berlin · New York

Neuerscheinungen

Hilde Götz

Immunologische Plasmaprotein-Diagnostik

Oktav. XII, 256 Seiten. Mit 106 Abbildungen. 1973.
Gebunden DM 96,—
ISBN 3 11 003772 6

Das Buch vermittelt Methodik und klinischen Anwendungsbereich der wichtigsten immunologischen Untersuchungstechniken zur Differenzierung menschlicher Plasmaproteine. Es werden die Immunelektrophorese (Grabar und Williams bzw. Scheidegger) mit reichlichem Anschauungsmaterial und Interpretationshilfen, die zweidimensionale Doppel-Immendiffusion (Ouchterlony) sowie die einfache, radiale Immendiffusion im Agargel (Mancini und Mitarb.) dargelegt.

Edward Muntwyler

Elektrolytstoffwechsel und Säure-Basen-Gleichgewicht

Übersetzt aus dem Englischen von
Wolf-Dieter Thomitzek
Klein-Oktav. 260 Seiten. Mit 33 Abbildungen. 1973.
Kartiert DM 14,80 ISBN 3 11 003950 8
(Sammlung Götschen Band 7137)

In den einführenden Abschnitten über den Wasser- und Elektrolythaushalt werden neben den Grundbegriffen Fragen der Verteilung in den Körperkompartimenten, die exkretorische Nierenfunktion und pathologische Abweichungen des Elektrolythaushaltes abgehandelt. Es folgt eine Überblick über den Mechanismus der Aufrechterhaltung des Säure-Basen-Gleichgewichts unter physiologischen und pathologischen Bedingungen und über die Mitwirkung der Lunge, der Nieren und anderer Organe. Fragen der klinischen Diagnostik werden ebenso klar dargestellt wie die Grundzüge einer rationellen Therapie pathologischer Zustände.

For USA and Canada:
Please send all orders to Walter de Gruyter Inc.,
162 Fifth Avenue, New York, N.Y. 10010 Tel. (212) 255-0808

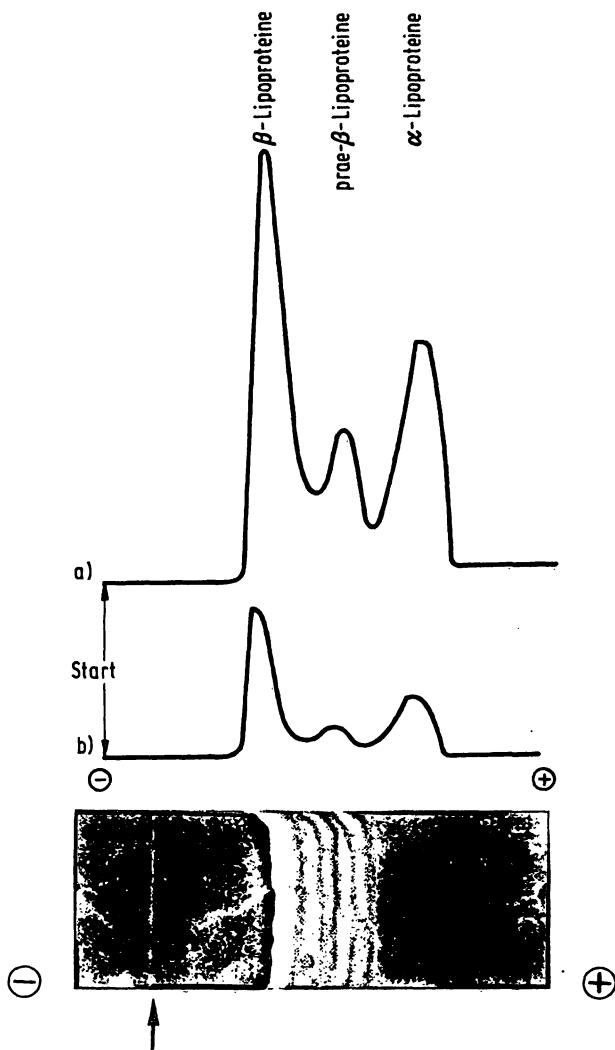


Abb. 1

Lipoprotein-Elektrophorese eines Normalserums (α -Lipoproteine 31 %, prä- β -Lipoproteine 14 %, β -Lipoproteine 55 %). Bei sonst identischen Versuchsbedingungen erfolgte die Färbung a) nach der genannten Methode (1,5 g Ölrot/l), b) nach der Vorschrift von KLEMENS (1) (0,5 g Ölrot/l)

aber durch Verwendung von Celluloseacetat und nicht zuletzt durch die geringe eingesetzte Probenmenge auch ohne Albuminzusatz größer (vgl. 1, 4–8). Die Intensität der Färbung ist abhängig von der Konzentration des gelösten Ölrot, weshalb wir 1,5 g Ölrot/l verwenden (vgl. Abb. 1). Die Färbung ist sowohl im Entfärbe- als auch im Transparenzbad stabil (1). Erst bei einer Verweildauer der Folien im Transparenzbad über 7 s, die normalerweise nicht annähernd erreicht wird, stellten wir eine Verschiebung der einzelnen Anteile an der

Gesamtextinktion zugunsten der prä- β -Lipoproteine um max. 6% auf Kosten der β -Lipoproteine fest. Der Anteil der α -Lipoproteine blieb konstant.

Da die prozentualen Anteile der einzelnen Lipidkomponenten in den Lipoproteinen als konstant angenommen werden kann (10, 11, 12), steht einer densitometrischen (semi-)quantitativen Auswertung nichts im Wege.

Hyperlipoproteinaemien vom Verteilungsmuster Typ I, IIa, IIb, IV und V nach FREDRICKSON (3) können meist sicher diagnostiziert werden (vgl. Tab. 1. u. 2). Die mit der Methode erhaltenen Normalwerte sind aus Tabelle 1 ersichtlich (vgl. l. c. (1), (10)). Laufende Kontrolluntersuchungen dienen der Beurteilung des Therapieerfolgs.

Erhebt sich der Verdacht auf das Vorliegen eines Verteilungsmusters vom Typ III, läßt sich häufig durch Veränderung der Elektrophoresebedingungen (Puffer: Veronal/Veronal-Na/Ca-Lactat 16,9 g/43,8 g, 1,9 g, dest. Wasser 5000 ml; 0,05 mol/l, pH 8,6; Trennzeit 60 min bei einer Trennstrecke von 5 cm) eine Abtrennung der prä- β -Fraktion von den β -Lipoproteinen erreichen. Andernfalls sind entsprechende Spezialuntersuchungen notwendig. (Ultrazentrifugation, immunologischer Nachweis von LP-X) (3, 13, 14).

Die stets in geringer Konzentration im Albuminbereich nachweisbaren freien Fettsäuren, die besonders nach längerer Lagerung über 4°C infolge der Serum-Lipase-Aktivität vermehrt sind, werden bei der densitometrischen Auswertung nicht berücksichtigt. Mehrfaches Einfrieren und Wiederauftauen der Proben führt durch Molekülcracking zu einer Vermehrung von Lipoproteinmolekül-Bruchstücken, die in der nachfolgenden Elektrophorese ein Tailing verursachen bzw. am Start liegen bleiben und so das Vorliegen von Chylomikronen vortäuschen. Zentrifugationsversuche (Sorvall high speed Zentrifuge RC2B mit 50000 g bei 0–4°C, Dauer 1–6 h) an mehrmals bei –18°C eingefrorenen und wieder aufgetauten Seren (Normalseren sowie Verteilungsmuster II und IV) ergaben eine deutliche Vermehrung von an der Oberfläche flottierenden Lipiden, die sich elektrophoretisch wie Chylomikronen verhielten. Mehrfach bei –78°C eingefrorene Seren zeigten diese Veränderungen nicht. Dennoch gingen wir dazu über, einmal aufgetaute Seren nicht wieder einzufrieren, sondern sofort zu verwenden und danach zu verwerfen.

Tab. 1

Lipoprotein-Verteilung (Mittelwerte und Standardabweichung) von 116 Seren aus einem vorwiegend kardiologischen Krankengut

Verteilungsmuster	n	α -Lipoproteine \bar{x} (rel.%) s	prä- β -Lipoproteine \bar{x} (rel.%) s	β -Lipoproteine \bar{x} (rel.%) s	Chylomikronen \bar{x} (rel.%) s
Normal	35	28,3 4,5	17,3 3,7	54,4 5,6	0 0
Typ IIa	17	9,5 5,5	11,2 6,6	79,4 8,8	0 0
Typ IIb	13	9,4 5,3	25,8 3,2	67,0 4,5	0 0
Verdacht auf Typ III	6	5,0 3,3	86,0* 14,7*		10,0 14,4
Typ IV	33	16,4 6,8	41,2 14,7	42,7 11,6	0 0
Typ V	12	19,7 6,9	32,3 9,5	30,2 6,3	14,2 8,3

* \bar{x} sowie s beziehen sich auf prä- β und β -Lipoproteine

Tab. 2
Lipidstaten von 15 Patienten

Fall Nr.	Serum- beschaffenheit	Cholesterin [g/l]	Triglyceride [g/l]	α - Lipoproteine [rel. %]	prä- β - Lipo- proteine [rel. %]	β - Lipo- proteine [rel. %]	Chylomikro- nen [rel. %]	Verteilungsmuster
1	klar	2,23	1,76	21	22	57	0	normal
2	klar	2,22	1,83	28	20	52	0	normal
3	klar	2,50	1,00	31	14	55	0	normal
4	klar	4,77	1,90	13	4	83	0	Typ IIa
5	klar	2,72	1,62	18	7	75	0	Typ IIa
6	klar	2,61	1,40	4	16	80	0	Typ IIa
7	klar	2,25	1,33	6	24	70	0	Typ IIb
8	trübe	3,00	3,95	10	27	63	0	Typ IIb
9	rahmig	7,09	26,20	3		85	12	Verdacht auf Typ III
10	milchig	5,20	21,20	9		91	0	Verdacht auf Typ III
11	milchig	5,00	19,00	10	42	48	0	Typ IV
12	milchig	7,05	8,20	5	37	58	0	Typ IV*)
13	trübe	2,33	3,69	17	48	35	0	Typ IV
14	milchig	3,44	8,39	15	50	30	5	Typ V
15	milchig	7,05	8,20	16	28	34	23	Typ V

*) Die Trennung der prä- β -Lipoproteine von den β -Lipoproteinen erfolgte erst bei Elektrophorese im modifizierten Puffersystem

Literatur

1. KLEMENS, U. H. & SCHMALBECK, J. (1969), diese Z. 7, 540 bis 546. — 2. CHIN, H. P. & BLANKENHORN, D. H. (1968), Clin. Chim. Acta 20, 305—314. — 3. FREDRICKSON, D. S. (1971), in Hyperlipidaemien (Berg, G. Hrsg.) 1. Aufl. Georg Thieme Verlag Stuttgart, S. 1—18. — 4. SCHÖNBRON, W. et al. in l. c. (3) S. 28, 37. — 5. GRABNER, W. et al. in l. c. (3) S. 45—52. — 6. KLEMENS, U. H. in l. c. (3) S. 53—57. — 7. GRETEN, H. & SEIDEL, D. in l. c. (3) S. 58—63. — 8. HUTH, K. (1969), Diagnostik 2, 413—416. — 9. Wissenschaftl. Tabellen GEIGY (1968), 7. Aufl. S. 596—600. — 10. GRABNER, W. et al. (1970), Clin. Chim. Acta 28, 299—310. — 11. KLEMENS, U. H. et al. (1972), Klin. Wochenschr. 50, 139—148. — 12. SEIDEL, D. (1971), in Fettstoffwechselstörungen (Schettler, G. Hrsg.) 1. Aufl., Georg Thieme Verlag Stuttgart, S. 24—47. — 13. SEIDEL, D. & GRETEN, H. (1970), Clin. Chim. Acta 30, 31—36. — 14. SEIDEL, D. in l. c. (3) S. 19—27. — 15. SCHWANDT, P. (1971), Internist 11, 481—487. — 16. ZÖLLNER, N. et al. (1969), diese Z. 7, 525—529. — 17. KLEMENS, U. H. & SCHMALBECK, J. (1970), diese Z. 8, 162—165; 166—169.

Dr. G. B. Ziegler
714 Ludwigsburg
Posilipostr. 49